

DNA-HOMOLOGIE UND TAXONOMIE DER GATTUNG CHLORELLA

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Wolfgang Kerfin
aus Engelsdorf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548222_0078

DNA-HOMOLOGIE UND TAXONOMIE DER GATTUNG CHLORELLA

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Wolfgang Kerfin
aus Engelsdorf



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 7. 1977

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. E. Schweizer

Erstberichterstatte: Professor Dr. E. Kessler

Zweitberichterstatte: Professor Dr. W. Haupt

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
II	MATERIAL UND METHODEN	3
III	ERGEBNISSE	9
	1) Präparation der unmarkierten Chlorella-DNA	9
	2) DNA-Markierung	
	a) in vivo	10
	b) in vitro	12
	3) DNA-DNA Hybridisierung	17
	4) DNA-Homologie von Chlorella	25
IV	DISKUSSION	47
V	ZUSAMMENFASSUNG	51
VI	LITERATUR	52

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
C.	Chlorella
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
LSC	Flüssigkeitsscintillationszähler
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Saline Sodium Citrate (0.15 M NaCl und 0.015 M Na-Citrat p_H 7.0)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

I. EINLEITUNG

Die einzelligen Grünalgen der Gattung *Chlorella* gehören seit mehr als 50 Jahren zu den für biochemische und physiologische Versuche am meisten verwendeten Pflanzen. Mit diesen einfach zu kultivierenden und schnell wachsenden Mikroorganismen wurden grundlegende Arbeiten zur Klärung der Photosynthese und des Nitratstoffwechsels durchgeführt. In den letzten Jahren begann man intensiv zu untersuchen, ob sich die Algen als Nahrungsmittel zur Deckung des Proteinbedarfs der Menschheit eignen.

Trotz der großen Bedeutung der Chlorellen ist es lange Zeit nicht gelungen, die Arten befriedigend voneinander abzugrenzen, da ihre weitgehende morphologische Übereinstimmung die Taxonomie nach den klassischen morphologisch-cytologischen Merkmalen erschwerte.

Um die Reproduzierbarkeit physiologischer und biochemischer Versuche mit *Chlorella*-Stämmen zu gewährleisten und um für wissenschaftliche Untersuchungen und technische Zwecke optimal geeignete Organismen auswählen zu können, war eine exakte Zuordnung der Stämme zu gut definierten Arten unerlässlich.

Das Problem der *Chlorella*-Taxonomie konnte erst durch die Untersuchung biochemischer und physiologischer Merkmale befriedigend gelöst werden. Dabei erwiesen sich das Vorhandensein von Hydrogenase, die Bildung von Sekundärcarotinoiden bei Stickstoffmangel (KESSLER et al., 1963), die Säureresistenz (KESSLER, 1965), die Thermophilie (KESSLER, 1972), der GC-Gehalt der Kern-DNA (HELLMANN u. KESSLER, 1974), die Produkte der Glukosevergärung (VINAYAKUMAR u. KESSLER, 1975), und die Salzresistenz (KESSLER, 1974) als taxonomisch wertvolle Merkmale, die zur Definition von 12 Taxa führten (KESSLER, 1976). FOTT und NOVAKOVÁ (1969) bestätigten in ihrer Arbeit,

daß 10 dieser Taxa auch morphologisch unterschiedlich sind. Die großen Unterschiede in den biochemischen und physiologischen Leistungen der Chlorellen, die bei Untersuchungen der morphologisch wesentlich besser definierten Gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus* nicht auftraten (KESSLER u. CZYGAN, 1967; KESSLER, 1967), sowie der weite Bereich, über den sich der GC-Gehalt bei *Chlorella* erstreckt (43% - 79%; nach HELLMANN u. KESSLER, 1974; bei *Ankistrodesmus* 63% - 70%, bei *Scenedesmus* 52% - 62%) führten zu der Frage, ob es sich bei *Chlorella* tatsächlich um eine natürliche Gattung handelt, oder um eine Zusammenfassung morphologisch ähnlicher, aber zum Teil nicht miteinander verwandter Arten.

Zur Klärung taxonomischer Fragen wurden bei Bakterien (DE LEY et al., 1966; MEYER et al., 1975), Pflanzen (BENDICH u. BOLTON, 1967) und Tieren (ENTINGH, 1970) DNA-DNA-Hybridisierungen mit Erfolg angewendet.

Es soll nun versucht werden, mit Hilfe dieser Methode zu klären, ob die *Chlorella*-Arten wirklich einheitlich sind, und welche Stämme bzw. Arten aus der Gattung ausgegliedert werden müssen.

II. MATERIAL und METHODEN

1) Versuchsobjekte und Kulturbedingungen

Es wurden die bei KESSLER (1967), KESSLER et al. (1968), KESSLER u. ZWEIER (1971) und HELLMANN u. KESSLER (1973) angegebenen 88 Stämme der Gattung *Chlorella* untersucht. Die Anzucht erfolgte unter sterilen Bedingungen in 6-l-Rundkolben im Dauerlicht (4000 Lux) bei 25°C unter Be-gasung mit Preßluft, der 2.5% CO₂ beigemischt wurde. Die Zusammensetzung des Nährmediums findet sich bei KESSLER u. CZYGAN (1970) und KESSLER u. ZWEIER (1971). *C. homosphaera* und *C. sorokiniana* 211-18 wuchsen in Normal-medium nach KESSLER u. CZYGAN (1970) unter Zusatz von 0.2% Hefeextrakt (Merck). Die Kulturdauer betrug, nachdem die Rundkolben mit je 150 ml Algensuspension (log-Phase) beimpft wurden, ca. eine Woche.

2) Ernte und Aufschluß der Zellen

Die Algen wurden mit einer Durchflußzentrifuge (WKF G50 K) bei 10 000 Upm und 4°C abgeerntet, zweimal mit eiskaltem aqua dest. und anschließend mit Aufschlußpuffer (0.01 M Tris/HCl, p_H 8.0) gewaschen.

Die gewaschenen Zellen wurden mit Glasperlen von 0.5mm Ø und ca. 12 ml Aufschlußpuffer zu einem homogenen Brei vermischt, wobei das Verhältnis Algen/Glasperlen ca. 1:4 (v/v) betrug. Die Paste hat die richtige Konsistenz, wenn sie gerade leicht beweglich wird, was man durch Pufferzugabe regelt.

Unter Kühlung auf 4°C wurden die Algen bei voller Tourenzahl der Zelmühle Vibrogen der Fa. Bühler 60 Sekunden aufgeschlossen. Der Aufschlußgrad betrug ca. 90% - 100%.

3) DNA-Präparation

Die Nukleinsäuren wurden in Anlehnung an die Methode von MARMUR (1961) extrahiert. Das Homogenat wurde mit weiteren 30 ml Aufschlußpuffer und 4 ml 25%iger SDS-Lösung suspendiert und 15 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe von 9 ml 5 M NaClO₄ und 30 ml Chloroform/i-Amylalkohol (24+1) wurde weitere 15 Minuten geschüttelt und anschließend 20 Minuten bei 4500 Upm zentrifugiert (Christ Junior O). Die wässrige Oberphase wurde mit der Pipette vorsichtig abgehoben, 20 Minuten bei 37 000xg zentrifugiert und mit Äthanol (Endkonzentration 80%) die Nukleinsäuren aus dem Überstand ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch dreiminütige Zentrifugation mit 10 000 Upm (WKF G50 K) sedimentiert; anschließend wurde das Pellet mit 0.1 x SSC gelöst.

4) Reinigung der DNA

Die gelösten Nukleinsäuren wurden zunächst für den RNA-Abbau mit Pankreas-RNase (0.1mg/ml) und RNase T₁ (50/ul) versetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgte ein Proteinabbau durch Zugabe von 0.1 mg/ml Pronase. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C mit diesem Enzym wurde eine weitere über Nacht angeschlossen. Um einen Abbau der DNA durch eventuell vorhandene DNasen zu vermeiden, wurden alle zugesetzten Enzyme durch 10 minütiges Erhitzen auf 80°C DNase-frei gemacht und die Verdauungsschritte in SSC durchgeführt.

An die Hydrolyseschritte schloß sich eine mehrmalige Chloroform/i-Amylalkohol-Ausschüttelung und schließlich eine Alkoholfällung der DNA an. Die gereinigte DNA wurde in 0.1 x SSC gelöst und zweimal gegen 0.1 x SSC dialysiert.

Die Reinheit der DNA wurde durch Aufnahme des Absorptionsspektrums im Bereich von 300 nm - 220 nm (Beckman DBG7) überprüft. Bei einigen Präparationen wurde zusätzlich der T_m -Wert bzw. die Hyperchromizität der DNA nach MARMUR u. DOTY (1962) in 0.1 x SSC im modifizierten PMQ III (Zeiss) bestimmt.

Die DNA wurde in 0.1 x SSC bei -20° aufbewahrt.

5) DNA-Markierung in vivo

Zu Beginn der log-Phase wurde die Chlorella-Kultur mit Tritium-markiertem Thymidin versetzt (BAYEN et al., 1973). Die eingesetzte Gesamtaktivität ergab im Medium eine Aktivität von 50 μ C in 350 ml. Die Algen wurden am Ende der log-Phase geerntet und die DNA wie oben angegeben präpariert.

6) DNA-Markierung in vitro

Die in vitro-Markierung der Chlorella-DNA wurde nach BORNKAMM et al. (1976) durchgeführt. 2.5 μ g lyophilisierte DNA wurden mit 460 μ l 0.05 M Tris/HCl pH 7.4, 7mM MgCl₂, 1mM Mercaptoäthanol aufgenommen. Der Ansatz enthielt 50 ng DNase. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurden 40 μ l KCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 0.15 M zugegeben. Anschließend wurde die DNase durch 10-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 70°C inaktiviert und die Lösung in Eis gestellt.

Für die Markierung wurden 10 nmol ³H-dTTP (spez. Akt. 50 C/mmol), 100 nmol unmarkiertes dATP, dGTP und dCTP, sowie 2.5 E Kornberg-Enzym (DNA-Polymerase I von E.coli, freundlicherweise von Dr. G. Bornkamm zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Nach 150 Minuten dauernder Inkubation bei 17°C wurden die Proteine mit Phenol denaturiert

und die DNA durch Chromatografie über Sephadex G50 von den Nukleotiden getrennt. Die Säule hatte einen Durchmesser von 0.7 cm und war 25 cm lang. Als Elutionspuffer wurde 0.01 M Tris/HCl p_H 7.4, 1mM EDTA, 0.1% Sarkosyl verwendet. Der Durchfluß betrug 5 Tropfen/min, jede Fraktion enthielt 10 Tropfen. Die Fraktionen mit markierter DNA wurden vereinigt und in 50 μ l Portionen bei -70°C aufbewahrt.

7) DNA-DNA Hybridisierung

Die Hybridisierungen wurden in Anlehnung an die von DENHARD (1966) beschriebene Methode durchgeführt. 50 μ g unmarkierter DNA wurden in 4 ml 0.1 x SSC in Sovirel-Reagenzgläsern mit Schraubverschluß 15 Minuten im kochenden Wasserbad dissoziiert, dann sofort im Eisbad abgekühlt und mit eiskaltem 10 x SSC auf 2 x SSC gebracht und in dieser Konzentration (10 μ g/ml) ohne Unterdruck auf Zellulosenitrat-Filter pipettiert (BENDICH u. MCCARTHY, 1970). Die Filter wurden vorher mit 2 x SSC gewaschen. Nach dem Auftragen der DNA wurden die Filter 4 Stunden bei 80°C im Trockenschrank getrocknet (CHOOI, 1971). Zur Vermeidung von unspezifischer Adsorption der markierten DNA an den Filtern wurden diese 8 Stunden bei 60°C mit DENHARD's Vorinkubationsmedium (3 x SSC, 0.4% BSA, 0.1% SDS) inkubiert. Die der Probenanzahl entsprechende Menge radioaktiver DNA wurde mit 5 N NaOH 0.5 N gemacht, 10 Minuten gekocht und anschließend im Eisbad sofort auf 0°C gekühlt. Die alkalische Lösung wurde mit der entsprechenden Menge 5 N HCl neutralisiert; zur Sicherheit wurde noch das 1.5 fache Volumen 2 N Tris/HCl p_H 7.0 dazupipettiert. Der neutrale Ansatz wurde mit dem Vorinkubationsmedium auf das der Probenanzahl (0.5 ml/Probe) entsprechende Volumen eingestellt und zu den Filtern, die in Zähl-

gläschen mit bereits 1 ml Vorinkubationsmedium inkubiert waren, hinzupipettiert.

Am Ende der Hybridisierung wurden die Filter gründlich in 3 Bechergläsern mit 0.03 M Tris/HCl p_H 9.0 und anschließend auf der Filterbank von jeder Seite mit 4 x 25 ml des gleichen Puffers gewaschen, mit LSC-Cocktail versetzt und die gebundene Radioaktivität bestimmt.

8) Analytische Methoden

DNA-Konzentrationen wurden mit dem Zeiss PMQ II photometrisch bestimmt unter der Annahme, daß der $E_{260}^{1\%}$ -Wert für native DNA 200 beträgt (MANDEL u. MARMUR, 1968).

Die T_m -Werte und die Hyperchromizität der DNA wurden in 0.1 x SSC im modifizierten PMQ III bestimmt (MARMUR u. DOTY, 1962). Radioaktive Proben wurden mit Scintillator-Cocktail (4g PPO, 0.2g POPOP in 1l 66% Toluol, 34% Triton X 100) versetzt und in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler der Fa. Packard gezählt.

Dieser Cocktail hat den Vorteil ca. 25% Wasser aufnehmen zu können und die Zellulosenitratfilter aufzulösen. Proben, die Filter enthielten, wurden nach Zugabe des Scintillators eine Stunde bei voller Tourenzahl des Köttermann-Schüttlers zur sicheren Auflösung der Filter geschüttelt.

9) Chemikalien

Die radioaktiven Präparate, 3H -Thymidin und 3H -Desoxythymidintriphosphat, wurden vom Radiochemical Center (Amersham) bezogen, Sephadex G 50 von Pharmacia (Uppsala), Pankreas-RNase und RNase T_1 von Boehringer (Mannheim), Kalbsthymus-DNA von Worthington Biochemicals Corp.,

Zellulosenitrat-Filter von der Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen, Pronase und Rinderserumalbumin von Serva (Heidelberg).

Alle übrigen Chemikalien waren, soweit verfügbar, p.a. Präparate.

III. ERGEBNISSE

1) Präparation der unmarkierten Chlorella-DNA

Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte in Anlehnung an die Methode von MARMUR (1961), wie bei HELLMANN (1973) beschrieben.

Wegen der bisherigen guten Erfahrung bei Aufschlüssen von Chlorellen mit Glasperlen von 0.5 mm Ø (Kerfin, 1973) wurde diese Methode auch für die DNA-Präparation verwendet. Schon WANKA et al. (1970) zeigten, daß durch Aufschluß mit Glasperlen hochmolekulare DNA aus Chlorellen gewonnen werden kann, obwohl sie mit 5 Minuten sehr lange Aufschlußzeiten anwandten. HELLMANN (1973) wies darauf hin, daß Glasperlen mit einem größeren Durchmesser als 0.3 mm die Aufschlußzeiten drastisch verkürzen können. Bei jeder Präparation konnten unter den angegebenen Bedingungen ca. 100 ml Paste, die 15' - 20 ml Algenpellet enthielt, in 60 Sekunden mit einer Effektivität von ca. 90% zerstörter Zellen aufgeschlossen werden.

Die darauf folgende Chloroform/i-Amylalkohol-, Äthanol-, RNase- und Pronase-Behandlung führte zu weitgehend RNA- und Protein-freien Produkten, was durch Aufnahme der Absorptionsspektren im Bereich von 300 nm' - 230 nm (Beckman DBG T) und bei einigen Präparationen durch Bestimmung des T_m -Wertes bzw. der Hyperchromizität der DNA überprüft wurde.

Tabelle 1 zeigt, daß die so gewonnene DNA in ihren Eigenschaften sehr gut mit den Werten anderer Autoren übereinstimmt.

T A B E L L E 1

DNA von	T _m in 0.1 SSC (°C)	Hyperchromizität(%)
C. fusca 211-8b	74.4 74.5 ^a 75.5 ^b	36 40 ^a 30 ^b
C. fusca 211-8h	74.7 74.5 ^a	39 40 ^a

Referenzen: HELLMANN, 1973 (a); BAYEN u. DALMON, 1974 (b)

Auf eine zusätzliche Reinigung und die Abtrennung der Chloroplasten-DNA durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (cf. HELLMANN, 1973, und DALMON u. BAYEN, 1975) wurde wegen der großen Anzahl von Präparationen und den für die Hybridisierung benötigten DNA-Mengen aus Zeit- und Kostengründen verzichtet. Der geringe Anteil der Chloroplasten-DNA mit nur ca. 2% der Gesamt-DNA (OSHIO u. HASE, 1968) würde den zusätzlichen Aufwand wohl nicht rechtfertigen, zumal bei den Hybridisierungen ein durch die Anwesenheit von Chloroplasten-DNA möglicher Fehler umgangen werden kann, indem die radioaktiv markierte DNA, die ja das Maß für den Hybridisierungsgrad ist, frei von Chloroplasten-DNA gemacht wird. Dies konnte experimentell bestätigt werden: der Hybridisierungsgrad von C. fusca 211-8b-DNA war bei Verwendung von CsCl-gereinigter DNA sowie bei Verwendung von nicht über CsCl gereinigter DNA völlig gleich.

2) DNA - Markierung

a) in vivo

Um den Metabolismus der Nukleinsäuren zu studieren, wurden auch bei Chlorellen verschiedentlich Versuche unter-

nommen, diese zu markieren. Will man spezifisch die DNA markieren, muß man eine thyminhaltige Vorstufe anbieten, da diese, vorausgesetzt es findet keine Metabolisierung statt, nur in die DNA eingebaut wird. FETTER u. ALTMANN (1968) fanden, daß sowohl mit ^{14}C -Thymin, als auch mit ^{14}C -Thymidin die DNA von *C. pyrenoidosa* (=fusca) 211/8b markiert werden kann, wobei die DNA mit Thymidin eine 10 mal höhere spezifische Aktivität erreicht als mit Thymin.

Im Gegensatz dazu berichten WANKA et al. (1970), daß weder mit Thymin noch mit Thymidin eine Markierung von *Chlorella*-DNA (ebenfalls Stamm 211/8b) erreicht werden kann. Die Zellen nehmen zwar das Desoxynukleosid auf, können es aber wegen der Abwesenheit einer aktiven Thymidinkinase nicht in die DNA einbauen, sondern degradieren es.

Die Ergebnisse von BAYEN et al. (1973) und DALMON et al. (1975) bestätigen die Ergebnisse von FETTER u. ALTMANN (1968), denn sie fanden bei Zugabe von ^{14}C -Thymidin zum Nährmedium radioaktive DNA, in die das Thymidin unverändert eingebaut worden war.

Es wurde also versucht, die für die Hybridisierungsversuche benötigte radioaktive DNA durch in vivo-Markierung der DNA autotroph und asynchron wachsender *Chlorellen* zu gewinnen. Es zeigte sich, daß sowohl aus *C. fusca* 211-15 als auch aus *C. fusca* 211-8b, zu deren normalem Nährmedium zu Beginn der log-Phase ^3H -Thymidin (50 $\mu\text{C}/350\text{ml}$ Nährmedium) gegeben wurde, nach der beschriebenen Methode radioaktiv markierte DNA gewonnen werden kann. Die spezifische Aktivität der DNA war mit ca. 300 cpm/ μg für die vorgesehenen Versuche allerdings viel zu gering. Nach BAYEN et al. (1973) ist nur 1/30 der Radioaktivität in der Kern-DNA lokalisiert, der weitaus größere Teil in der Chloroplasten-DNA. Wegen der mangelnden Effek-

tivität der Markierung wurde nicht weiter untersucht, ob hier eine den Ergebnissen von BAYEN et al. (1973) entsprechende Verteilung der Radioaktivität zwischen Kern- und Chloroplasten-DNA vorliegt. Sollte dies der Fall sein, würde es bedeuten, daß nach einer Trennung der beiden DNA's über CsCl eine spezifische Aktivität der Kern-DNA, die ja für die Hybridisierungen benötigt wird, von ca. 10 cpm/ μ g vorhanden ist.

Es wurde deshalb die elegantere und wesentlich effektivere Methode der *in-vitro*-Markierung angewandt.

b) *in vitro*

Für die *in vitro*-Markierung wurde hochreine Kern-DNA verwendet; die Chloroplasten-DNA wurde durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt, um ihren möglichen Einfluß auf die Hybridisierungsergebnisse auszuschließen. Für die Replikation der DNA wird DNA-Polymerase I von *E. coli* verwendet, da nach KORNBERG (1974) keine spezifische, vom gleichen Organismus stammende Polymerase benötigt wird. Damit das Enzym sich an den DNA-Doppelstrang anheften und aktiv werden kann, müssen unbedingt Einzelstrangbrüche mit einem freien 3'-hydroxyl-Ende vorhanden sein. An diesen "nicks" wird das aktive Zentrum des Enzyms gebunden und die Replikation gestartet (KELLY et al., 1970). Bietet man nun dem Enzym die benötigten Desoxynukleosid-5'-triphosphate an, beginnt es nicht nur in 5'-3'-Richtung den "Primer"-Strang entsprechend der Matrize zu verlängern, sondern entwickelt in der gleichen Richtung eine Exonuklease-Aktivität. Der Primer-Strang wird also am 5'-Ende des nicks hydrolysiert, während er am 3'-Ende durch Addition der entsprechenden Nukleotide wieder synthetisiert wird. Für die *in vitro*-Markierung ist es wichtig, daß das Enzym

tatsächlich nur diese in Abbildung 1a dargestellte Reparatur durchführt und nicht durch die in Abbildung 1b gezeigten Reaktionen DNA neu synthetisiert. Hierbei wird der Primer-Strang vom 5'-Ende her nicht hydrolysiert, sondern nur vom komplementären Strang "abgehoben" (displacement synthesis). Die Polymerase kann nun die Matrize wechseln und an dem freien Einzelstrang weiter-synthetisieren (template switching). Durch Öffnen des so entstandenen Doppelstranges und Umfalten (branch migration) ist ein Teil der parentalen DNA zum neu-synthetisierten Doppelstrang geworden (KORNBERG, 1974), was bei Hybridisierungen einen höheren Anteil dieser Sequenzen vortäuschen würde. Diese Reaktion muß also unbedingt vermieden werden. Nach DUMAS et al. (1971) gibt es für diese Reaktionen diskrete Temperaturschwellen, wobei man bei einer Temperatur von 17°C sicher sein kann, daß keine "displacement synthesis" stattfindet.

Im Experiment wurde die "nick"-Bildung mit der geringen Menge zugegebener DNase durchgeführt. Nach der Inkubation bei 37°C wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C und sofortiges Abkühlen auf 0°C inaktiviert und die oben beschriebene Reparatur der DNA bei 17°C unter Zugabe der Desoxynukleosidtriphosphate, wobei das Desoxythymidintriphosphat hochspezifisch tritiummarkiert war, und des Kornberg-Enzyms gestartet. Die Aktivität der Polymerase wird während der 2.5 Stunden dauernden Reaktion durch Aufnahme einer Kinetik überwacht. Dabei wird dem Reaktionsansatz alle 30 Minuten eine 5 µl-Probe entnommen und mit einer TCA-Fällung die Menge der säurefällbaren (entspricht der in die DNA eingebauten) Radioaktivität bestimmt. Für den Fall, daß keine DNA-Neusynthese stattfindet, darf die Menge der eingebauten Radioaktivität nicht stetig zunehmen, sondern

Nicked template

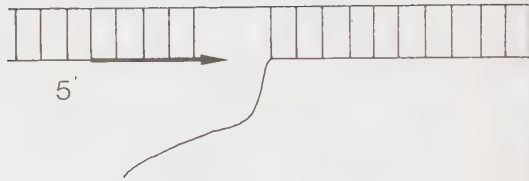


Nick translation

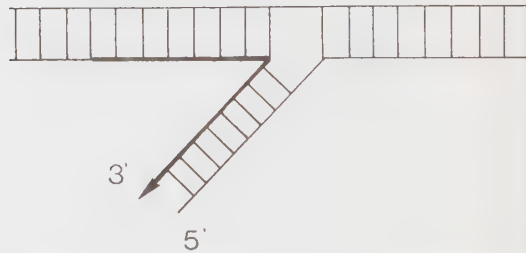


1a

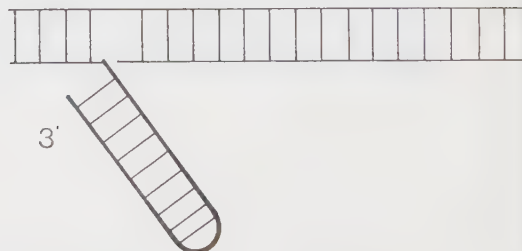
Strand displacement



Template switching



Branch migration



1b

Abb. 1: Reaktionen der DNA-Polymerase I aus *E. coli*
(nach KORNBERG, 1976)

muß nach einiger Zeit ein Plateau erreichen. Abbildung 2 zeigt die Kinetik einer DNA-Markierung, die diese Annahme bestätigt.

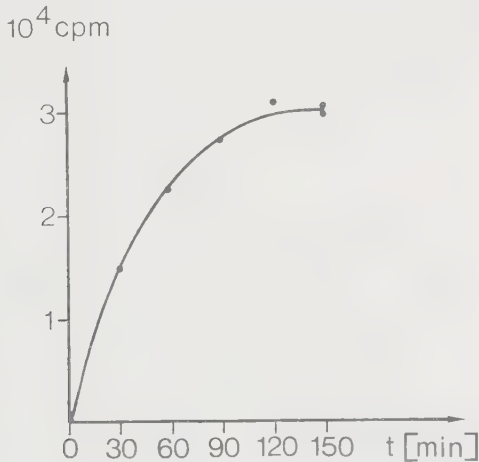


Abb. 2: Kinetik einer in vitro-Markierung von Chlorella-DNA

Nach 2.5 Stunden wird die DNA durch Ausschütteln mit Phenol gereinigt. Abschließend wird die wässrige Phase abgehoben und die Nukleotide durch Chromatografie über eine Sephadex G 50-Säule abgetrennt. Das Eluat wird in 10-Tropfen-Fractionen gesammelt; jeder Fraction entnimmt man 5 μ l und mißt die Radioaktivität. Abbildung 3 zeigt ein solches Elutionsdiagramm. Die Sterne bezeichnen die Radioaktivität. Die radioaktive DNA enthaltenden Fractionen werden vereinigt und in kleinen Portionen eingefroren.

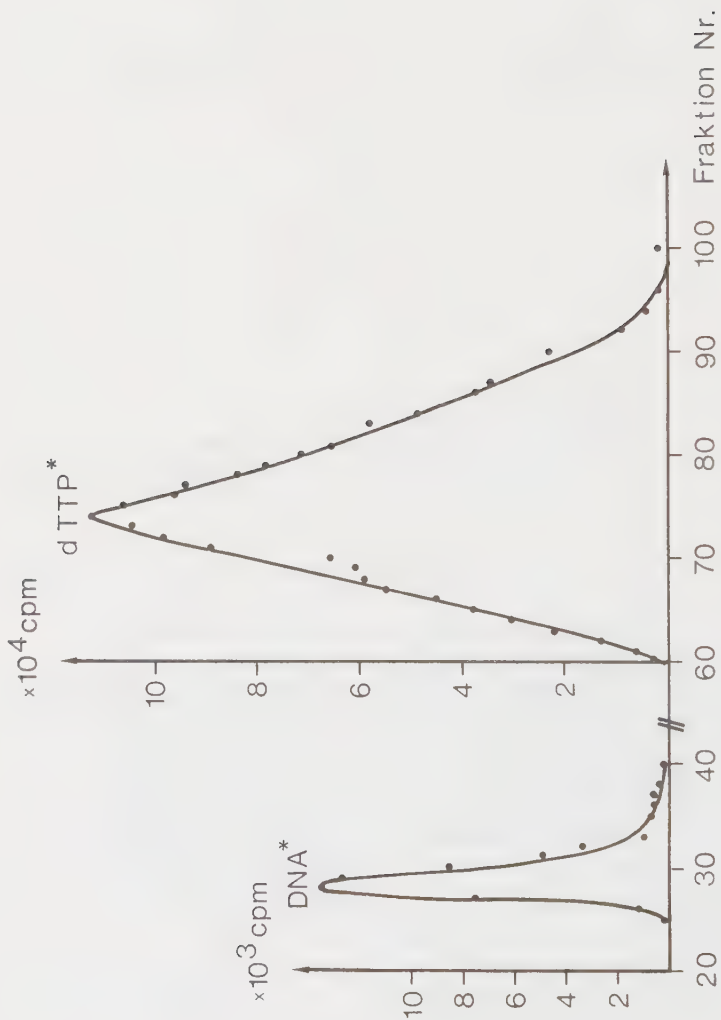


Abb. 3: Reinigung in vitro markierter DNA durch Chromatografie an Sephadex G 50

Die auf diese Art markierte *Chlorella*-DNA hatte eine spezifische Aktivität von ca. 10^6 cpm/ μ g. Es wurde die Kern-DNA von *C. fusca* 211-8b und von *C. vulgaris* 211-8m in vitro markiert; die Markierung von *C. sorokiniana* 211-33 DNA scheiterte an der käuflichen Polymerase (Boehringer), die einen hohen DNase-Gehalt hatte, wodurch die DNA nach der 2.5 stündigen Inkubation vollständig degradiert wurde.

3) DNA - DNA Hybridisierung

Native DNA besteht aus zwei komplementären Einzelsträngen; der Doppelstrang wird durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren Adenin/Thymin und Guanin/Cytosin stabilisiert. MARMUR et al. (1963) berichten von der bemerkenswerten Tatsache, daß sich nach Dissoziation die komplementären Einzelstränge erkennen und unter günstigen Bedingungen durch Reassoziaton der nativen DNA ähnliche doppelsträngige Moleküle bilden. Diese Reassoziationsreaktion der DNA erwies sich als gutes Mittel, um den Anteil der Sequenzen zu bestimmen, den die DNA's zweier verwandter Arten gemeinsam haben. Die Technik ist recht einfach: man läßt einen Überschuß einzelsträngiger DNA der Art A mit einer geringen Menge radioaktiver, einzelsträngiger DNA der Art B unter günstigen Bedingungen reagieren, trennt die einzelsträngig gebliebene DNA von den doppelsträngigen "Hybriden" und mißt die Radioaktivität. Die Konzentration der radioaktiven DNA wird niedrig gehalten, um zu vermeiden, daß sie mit sich selbst reagiert (KOHNE, 1968). Diese Methode wurde schon recht früh zur Klärung taxonomischer Fragen bei Bakterien (DE LEY u. PARK, 1966; DE LEY et al., 1966), Pflanzen (BENDICH u. BOLTON, 1967; BENDICH u. MCCARTHY, 1970;

CHOOI, 1971) und Tieren (LAIRD u. MCCARTHY, 1968; ENTINGH, 1970) verwendet.

Bei Betrachtung der Reassoziationskinetiken der DNA niederer Organismen zeigt sich, daß mit zunehmender Komplexität (bei Prokaryonten entspricht sie der Genomgröße, BRITTEN et al., 1974) der DNA die Konzentration und Reaktionsdauer erhöht werden muß, um die Renaturierung beobachten zu können. Für die Reassoziationen der DNA von Eukaryonten hätte man wegen der enormen "Verdünnung" individueller Sequenzen durch die große DNA-Menge erwartet, daß die Reaktionen erst nach monatelanger Inkubationszeit bei praktikablen Konzentrationen vollendet wären (BRITTEN u. KOHNE, 1968). Frühere Hybridisierungsversuche mit der DNA verschiedener Vertebraten zeigten, daß mit den für niedere Organismen verwendeten Hybridisierungsmethoden auch in diesem Fall ein bestimmter Teil der DNA reagiert (HOYER et al., 1964), bei Mäuse-DNA ca. 30%. Da ein Teil dieser DNA (ca. 10%) sogar extrem schnell reassoziert, schneller als z.B. die DNA des Bakteriophagen T4, lag der Schluß nahe, daß es sich um Nukleotidsequenzen handelt, die sich häufig wiederholen (repetitive Sequenzen) (BRITTEN u. KOHNE, 1968). BRITTEN u. KOHNE (1968) sowie MELLI u. BISHOP (1969) konnten zeigen, daß bei den DNA-Hybridisierungsexperimenten mit in Agar eingebetteter (cf. BENDICH u. BOLTON, 1967) bzw. an Nitrozellulose-Filtern gebundener DNA (cf. BENDICH u. MCCARTHY, 1970) nur diese repetitiven Sequenzen reagieren können, da sie durch ihre hohe Wiederholungsrate in genügend hoher "Konzentration" in der Gesamtmenge der DNA vorhanden sind und somit wesentlich eher auf eine komplementäre Sequenz treffen können als die nicht-repetitiven "single copy" Sequenzen.

Die repetitiven Sequenzen sind offenbar ein charakteristisches Merkmal, das die DNA höhere Organismen von der Prokaryonten-DNA unterscheidet (PARDUE, 1975). Für Chlorella beschrieben BAYEN u. DALMON (1974) ebenfalls einen schnell reassoziiierenden Teil der DNA, der die rRNA codieren soll (cf. PARDUE, 1975). Nachdem die ersten DNA-Hybridisierungen mit fixierter DNA auf einer taxonomisch sehr breiten Basis (bei HOYER et al., 1964 sind es einige Vertebraten; BENDICH u. McCARTHY, 1970 verglichen die DNA von 4 Gräsern) durchgeführt wurden, konnten LAIRD u. McCARTHY (1968) mit Filterhybridisierungen von 3 Drosophila-Arten zeigen, daß sich diese durch ihren Hybridisierungsgrad klar voneinander abgrenzen lassen. Diese Ergebnisse, die von ENTINGH (1970) durch Filterhybridisierungen mit der DNA von 18 Arten der Gattung Drosophila bestätigt und erweitert wurden, waren nach den Aussagen von KOHNE (1968), BRITTEN u. KOHNE (1968) und PARDUE (1975) zu erwarten. Nach den zuletzt genannten Autoren sind die repetitiven Sequenzen extrem artspezifisch: sie sind innerhalb einer Art konstant, was ENTINGH (1970) auch an zwei Stämmen einer Art zeigen konnte; sie divergieren allerdings innerhalb einer Gattung von Art zu Art, was auch GOLDBERG et al. (1972) durch Filterhybridisierungsversuche bei der Gattung Cucurbita bestätigen.

Nach diesen Betrachtungen über DNA-DNA-Hybridisierungen mit an Filter gebundener DNA, über die Art der Reaktion und die mit den Ergebnissen möglichen Aussagen, erscheint es sinnvoll, diese Methode wegen ihrer relativ einfachen Handhabung und des geringen Materialaufwandes bei der Vielzahl der zu untersuchenden Chlorella-Stämme anzuwenden. Sie läßt eine Klärung der primär wichtigen Fragen erwarten:

1) Handelt es sich bei *Chlorella* wirklich um eine echte Gattung, oder nur um ein Konglomerat morphologisch ähnlicher, aber z. T. nicht miteinander verwandter Arten?

2) Sind die zu einer Spezies zusammengefaßten Stämme wirklich einheitlich, oder gehören sie eventuell zu verschiedenen Taxa (KESSLER, 1976)?

Die Hybridisierungsexperimente wurden nach der von DENHARDT (1966) beschriebenen Methode durchgeführt. Man nützt dabei die Tatsache aus, daß denaturierte DNA an Zellulosenitrat-Filtern haften bleibt. Die übrigen möglichen Bindungsstellen am Filter werden durch Inkubation in einer serumalbuminhaltigen Lösung abgesättigt, um unspezifische Anheftung der als Hybridisierungspartner eingesetzten radioaktiven DNA zu verhindern. Nachdem ein Vorversuch unter nicht optimalen Bedingungen gezeigt hatte, daß diese Methode für Hybridisierungsversuche mit *Chlorella*-DNA erfolgreich angewendet werden kann, wurden Versuche durchgeführt, um diese weitgehend zu optimieren.

Nach BRITTEN u. KOHNE (1968) werden DNA-Reassoziationen von 4 Faktoren beeinflusst:

I) Im Reaktionsmedium muß eine ausreichende Kationenkonzentration vorhanden sein, da unterhalb $0,01 \text{ M Na}^+$ die Reassoziationsreaktion vollständig blockiert wird. Diese Bedingung wurde auf jeden Fall erfüllt, da die Reaktion in einem an DENHARDT's Vorinkubationsmedium angelehnten Medium ($3 \times \text{SSC}$) durchgeführt wurde.

II) Die Temperatur sollte während der Inkubation möglichst nahe der für Reassoziationen optimalen Temperatur von $T_m - 25^\circ\text{C}$ sein (cf. BRITTEN et al., 1974). Wegen der breiten Streuung des GC-Gehaltes der *Chlorellen* wurde als günstige Temperatur für alle Hybridisierungen die von vielen Autoren verwendete Temperatur von 60° ver-

wendet, da sie bei den Vorversuchen gute Ergebnisse zeigte und eine Steigerung auf 65°C keinen Einfluß hatte.

III) Die Inkubationszeit und die eingesetzten DNA-Mengen müssen ausreichend bemessen sein, um eine genügende Anzahl von Kollisionen zwischen den Molekülen zu ermöglichen.

Nachdem bei der in vitro-Markierung insgesamt nur 2.5 µg radioaktive DNA erhalten wurden, war klar, daß die von

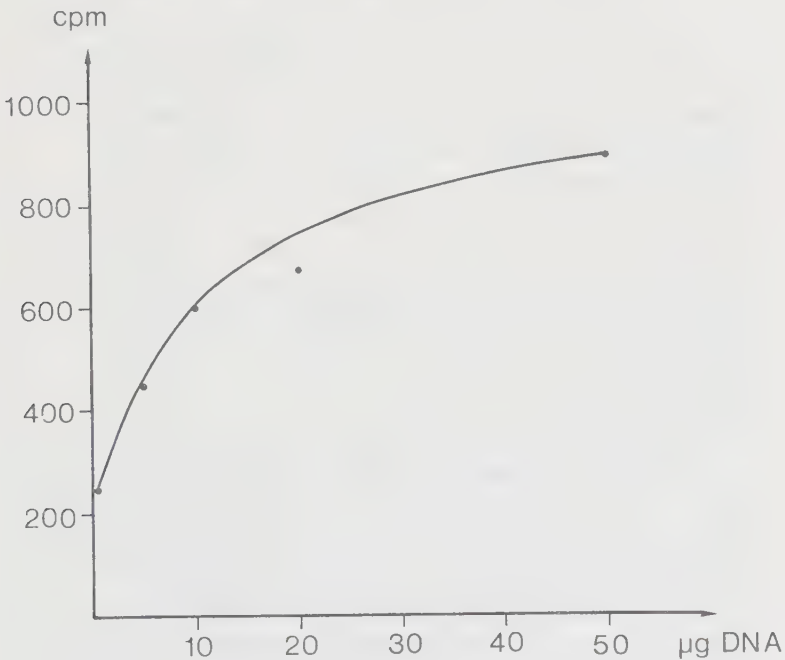


Abb. 4: Optimale Beladung der Filter: steigende Mengen unmarkierter DNA wurden mit konstant 10^4 cpm label-DNA hybridisiert (Chlorella fusca 211-8b)

anderen Autoren angegebenen Mengen "label" nicht eingesetzt werden konnten (ENTINGH, 1970: 4-7 μ g; GOLDBERG et al., 1972: 0.3 μ g; BENDICH u. McCARTHY, 1970: 1 μ g). Dies war andererseits für das Erreichen vernünftiger Zählraten auch gar nicht notwendig, da die spezifische Aktivität der hier verwendeten DNA um den Faktor 10^3 höher lag als bei den o. a. Autoren.

Zur Untersuchung des Einflusses der Menge filtergebundener DNA auf den Hybridisierungsgrad wurde das eingesetzte label mit 10^4 cpm konstant gehalten. Da auf jeden Fall mit einem Überschuß an nicht markierter DNA gearbeitet wird, ist zu erwarten, daß eine Erhöhung der Menge filtergebundener DNA keinen Einfluß auf die Hybridisierung hat. Abbildung 4 zeigt, daß eine 50-fache Steigerung der Beladung des Filters nur eine 4-fache Erhöhung der Zählrate ergibt und eine 10-fache Steigerung das Ergebnis gerade verdoppelt. Als Resultat erhält man, wie von GOLDBERG et al. (1972) beschrieben, eine Sättigungskurve. Um optimale Zählraten zu erhalten, wurden bei allen folgenden Hybridisierungen gleichbleibend 50 μ g nicht markierter DNA auf die Filter aufgetragen.

Dagegen muß bei einer Erhöhung der Menge radioaktiver DNA die Zählrate direkt proportional ansteigen, da die große Menge filtergebundener DNA mit dem hier möglichen label-Angebot nie abgesättigt werden kann, also jede weitere Menge markierter DNA dem Hybridisierungsgrad entsprechend gebunden wird. Abbildung 5 zeigt die Bestätigung dieser Annahme. Die Zählrate liegt unterhalb des in Abbildung 4 gezeigten Maximums, da bei diesen Versuchen noch mit einer Filterbeladung von 20 μ g unmarkierter homologer DNA gearbeitet wurde; sie entspricht allerdings dem für diese Beladung angegebenen Wert.

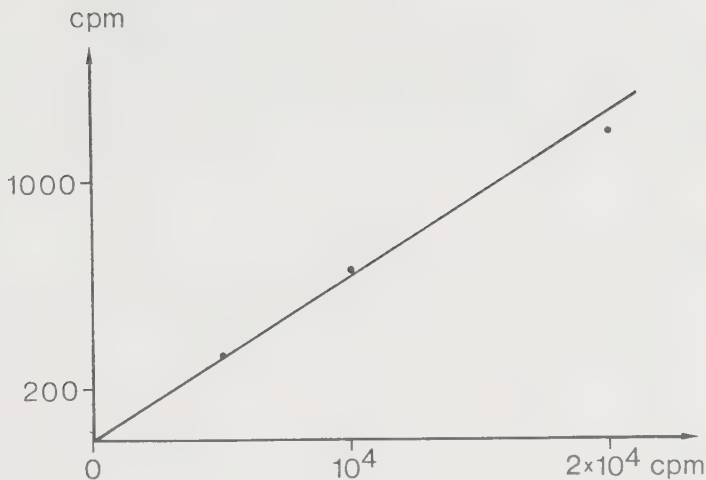


Abb. 5: Abhängigkeit der Zählrate von der Menge radioaktiver DNA. Es wurden jeweils 20 μ g filtergebundener DNA eingesetzt (Chlorella fusca 211-8b)

Für alle weiteren Hybridisierungsversuche wurde ein Einsatz von 10^4 cpm ($\hat{=}$ 8 ng) radioaktiv markierter DNA als ausreichend für gute Zählraten angesehen.

Da die Zählrate der Menge des eingesetzten labels direkt proportional ist, muß die für den Hybridisierungsansatz vorgesehene Radioaktivität sehr genau auf den Wert von 10^4 cpm eingestellt werden.

Die Konzentration der in den beschriebenen Versuchen eingesetzten label-DNA ist mit ca. 8 ng/1.5 ml wesentlich geringer als bei ENTINGH (1970) mit 4 - 7 μ g/0.15ml und bei GOLDBERG et al. (1972) mit 0.3 μ g/0.2ml angegeben.

Folglich ist zu erwarten, daß die optimale Hybridisierungsdauer wesentlich länger ist als bei den höheren label-Konzentrationen. Nach Bestimmung der optimalen Inkubationszeit (siehe Abbildung 6) wurden alle Ansätze 3 Tage hybridisiert.

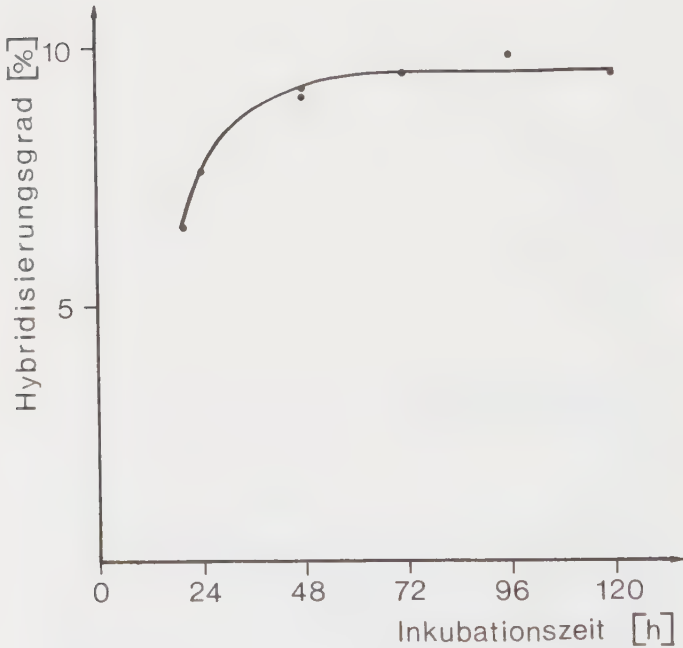


Abb. 6: Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer.
50 μ g DNA filtergebunden, 10^4 cpm label-DNA
(C. fusca 211-8b), T = 60°C

IV) Die Reassoziationsreaktion wird weiterhin von der Größe der DNA-Moleküle beeinflusst.

Kleinere DNA-Moleküle ergeben besser reproduzierbare Reassoziationsraten (BRITTEN u. KOHNE, 1968). Außerdem reagieren sie nicht untereinander unter Bildung sogenannter Netzwerke, wie dies bei langen DNA-Einzelsträngen beobachtet wurde (BRITTEN et al., 1974). Dabei reassoziieren kurze verwandte Sequenzen verschiedener benachbarter Einzelstränge zu kurzen gemeinsamen Doppelstrangregionen, wodurch die betroffenen DNA-Stränge ein dreidimensionales Netz bilden und für die gewünschte Hybridisierungsreaktion unbrauchbar geworden sind.

Ein weiterer Vorteil der Degradierung langer Einzelstränge liegt darin, daß nur die kurzen, reassozierten Sequenzen am Filter haften bleiben und also nur die Radioaktivität dieser, der filtergebundenen DNA homologen Teile bestimmt wird. Es ist nicht wie bei langen Sequenzen möglich, daß man die Radioaktivität der nicht-homologen, aber auf dem gleichen Strang befindlichen Sequenzen mitbestimmt, was durch eine erhöhte Zählrate ein besseres Hybridisierungsergebnis als das tatsächliche vortäuschen würde.

Die radioaktiv markierte DNA wird also nicht nur dissoziiert, sondern durch Erhitzen in alkalischem Milieu zu kurzen Sequenzen degradiert (WETMUR u. DAVIDSON, 1968).

4) DNA - HOMOLOGIE VON CHLORELLA

Nach den oben beschriebenen Vorversuchen wurden DNA - DNA Filterhybridisierungen mit unmarkierter filtergebundener DNA aller 88 Chlorella-Stämme und ³H-markierter DNA in Lösung von *C.fusca* 211-8b und *C. vulgaris* 211-8m durchgeführt, um den Anteil homologer Sequenzen

der Chlorellen zu bestimmen.

Bei jedem Hybridisierungsversuch wurden von jeder DNA-Art Doppelansätze gemacht. Wenn das Ergebnis beider Ansätze um mehr als 2 - 3% (durchschnittlicher Fehler) differierte oder wenn es vollkommen unerwartet ausfiel (siehe z. B. *C. fusca* 211-8e und 211-8g), wurde der Versuch zur Kontrolle wiederholt.

Die homologen Reaktionen ergaben für *C. fusca* 211-8b 9.5% und für *C. vulgaris* 211-8m 12.1% Hybridisierung (siehe Tabelle 2).

Zur Bestimmung des "background" (unspezifische Anheftung) wurde Prokaryonten-DNA und DNA nicht verwandter Eukaryonten eingesetzt. Im Falle der Prokaryonten, die nach BRITTEN u. KOHNE (1968) keine repetitiven Sequenzen haben, blieb das Ergebnis in jedem Fall unter einem Prozent (Tabelle 2).

Die Eukaryonten-DNA hybridisierte zu ca. 2%, ein Wert den auch BENDICH u. McCARTHY (1970) für Gramineen-DNA mit Meerschweinchen-DNA als background-Kontrolle erhielten.

T A B E L L E 2

filtergebundene DNA	³ H-markierte DNA	
	211-8b	211-8m
211-8b	100% x)	--
211-8m	--	100% x)
<i>Escherichia coli</i>	0.8%	--
<i>Clostridium perfringens</i>	0.3%	--
Lachssperma	1.8%	2.0%
Kalbsthymus	2.5%	--

x) entspricht den absoluten Werten von 9,5% Hybridisierung für die homologe Reaktion von *C. fusca* 211-8b und 12,1% von *C. vulgaris* 211-8m.

T A B E L L E 3

filtergebundene DNA		³ H-markierte DNA	
Art	Stamm	211-8b	211-8m
<u>C. fusca</u> var. <u>vacuolata</u> Shihira et Krauss	211-8a	100	18.5
	211-8b	100	21.9
	211-8h	110	36.9
	211-11n	100	24.0
	211-15	95.5	34.6
	C-1.1.10	100	29.7
	211-8c	64.0	12.7
	211-11m	62.7	15.4
	211-8e (Gö)	34.7	13.5
	211-8g	25.2	8.9
<u>C. fusca</u> var. <u>fusca</u> Shihira et Krauss	343	16.8	15.4
<u>C. fusca</u> var. <u>rubescens</u> (Dangeard) Kessler et al.	232/1	23.1	26.9
<u>C. homosphaera</u> Skuja	211-8e (Ca.)	6.3	6.9
<u>C. luteoviridis</u> Chodat	211-2a	15.8	18.5
	211-2b	16.8	18.5
	211-3	10.5	13.9
	211-4	12.6	18.5
	211-5a	13.1	13.9
	211-5b	12.6	10.8

T A B E L L E 3 (Fortsetzung)

filtergebundene DNA		³ H-markierte DNA	
Art	Stamm	211-8b	211-8m
<u>C. saccharophila</u> (Krüger) Migula	211-1b	7.4	14.4
	211-1c	7.9	17.5
	211-1d	7.9	21.2
	211-1f	6.3	13.7
	211-9a	24.2	30.8
	211-9b	24.2	32.9
	211-1a	27.9	37.7
	C-1.3.1	13.7	34.3
<u>C. zofingiensis</u> Dönz	211-14a	51.5	26.9
	211-14b	53.6	26.9
	211-14c	52.1	26.9
	C-1.2.1	44.2	13.5
<u>C. kessleri</u> Fott et Nováková	211-11g	10.5	13.9
	211-11h	11.6	13.2
	397	9.5	13.5
	398	5.3	5.4
	C-1.1.1	7.4	6.2
	C-1.1.12	4.7	6.5
	C-1.2.2	4.2	4.6
<u>C. minutissima</u> Fott et Nováková	C-1.1.9	10.5	12.3

T A B E L L E 3 (Fortsetzung)

filtergebundene DNA		³ H-markierte DNA	
Art	Stamm	211-8b	211-8m
<u>C. vulgaris</u>	211-81	34.7	100
Beijerinck	211-8m	32.5	100
	211-11c	33.1	100
	211-111	32.6	83.9
	211-11p	30.5	79.2
	211-19	33.1	100
	211-21	32.6	86.9
	395	36.8	100
	396	36.8	94.6
	211-1e	22.1	73.6
	211-11b	17.4	58.8
	211-11q	20.0	60.3
	211-1f	12.1	33.7
	211-11j	15.2	38.1
	211-11s	13.6	33.1
	211-11t	12.6	33.9
	211-12	13.7	37.0
	211-30	18.4	27.2
	211-11r	11.0	12.7

T A B E L L E 3 (Fortsetzung)

filtergebundene DNA		³ H-markierte DNA	
Art	Stamm	211-8b	211-8m
<u>C. sorokiniana</u>	211-8k	25.2	27.4
Shihira et Krauss	211-11d	24.2	29.5
(=C. vulgaris f. tertia	211-11k	25.2	33.6
Fott et Nováková)	211-32	25.2	26.2
	Sless 1	26.3	28.8
	1-9-30	25.2	24.7
	211-18	23.1	24.7
	211-33	31.6	32.2
	211-34	37.9	48.3
	211-31	32.6	36.3
	Sless 2	34.7	36.6
	Prag A14	17.9	31.5
	211-40a	14.2	30.1
	211-40c	14.7	32.5
	C-1.1.8	15.8	26.7
	C-1.6.7	15.8	18.5

T A B E L L E 3 (Fortsetzung)

filtergebundene DNA		³ H-markierte DNA	
Art	Stamm	211-8b	211-8m
C. protothecoides Krüger	211-7a	7.4	11.6
	211-7b	5.3	4.8
	211-7c	8.4	18.5
	211-7d	5.3	9.8
	211-8d	5.3	4.1
	211-10a	4.2	3.4
	211-10b	4.7	6.9
	211-10c	5.3	8.5
	211-10d	4.7	6.9
	211-10e	4.7	3.8
	211-11a	13.7	16.4
	211-11i	5.3	4.8
	211-13	6.3	6.9
	211-17	5.3	7.5

T A B E L L E 4

Hybridisierung der DNA je eines Stammes der Gattungen Ankistrodesmus, Scenedesmus und Prototheca mit ³H-markierter DNA von Chlorella vulgaris 211-8m

filtergebundene DNA		% Hybridisierung mit 211-8m
Art	Stamm	
A. braunii	202-7c	21.2
S. obliquus	276-3b	26.7
P. krügeri	263-6	3.4

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Hybridisierungen mit markierter DNA von *C. fusca* 211-8b und von *C. vulgaris* 211-8m mit der DNA aller 88 *Chlorella*-Stämme zusammengestellt, und zur Veranschaulichung in den Abbildungen 6 - 13 grafisch dargestellt. Es zeigt sich, daß konstantes Hybridisierungsverhalten einer Art gegenüber *C. fusca* einer konstanten Hybridisierung gegenüber *C. vulgaris* entspricht.

Für das nicht übereinstimmende Ergebnis der Kreuzreaktionen zwischen *C. fusca* 211-8b und *C. vulgaris* 211-8m (im Falle 8b-DNA markiert: 32.5%; wenn 8m markiert: 21.9%) findet sich eine Erklärung bei BENDICH u. McCARTHY (1970) und SEARCY (1970). Danach sind nicht-reziproke Ergebnisse bei Kreuzhybridisierungen verschiedener markierter DNA's auf eine unterschiedliche Genomgröße und/oder eine unterschiedliche Anzahl der Familien verwandter Sequenzen zurückzuführen, wobei noch nicht klar ist, was davon für *Chlorella* zutreffend ist.

Chlorella fusca

Betrachtet man die Ergebnisse der Hybridisierung mit *C. fusca* var. *vacuolata* (10 Stämme), *C. fusca* var. *fusca* und *C. fusca* var. *rubescens* (je 1 Stamm) (Tabelle 3 und Abbildung 6), so wird deutlich, daß letztere mit Sicherheit nicht zu *C. fusca* gerechnet werden können, da sie eine viel zu geringe DNA-Homologie mit *C. fusca* var. *vacuolata* und eine fast gleich große mit *C. vulgaris* haben. Diese beiden Stämme unterscheiden sich auch durch einen wesentlich höheren GC-Gehalt der DNA (55.3% Stamm 343, 57.8% Stamm 232/1 gegenüber 50.3% *C. fusca*) deutlich von den übrigen Stämmen (HELLMANN u. KESSLER, 1974). FOTT et al. (1975) fanden durch elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellwandstruktur von *C. fusca* var. *fusca*, daß es sich um Einzelzellen einer

Scenedesmus-Art handelt, und daß dieser Stamm daher aus der Gattung Chlorella ausgegliedert werden muß. Nach VINAYAKUMAR u. KESSLER (1970) weicht *C. fusca* var. *rubescens* beim Vergleich der Gärungsprodukte von Glukose von den anderen Stämmen ab.

Von den 10 Stämmen *C. fusca* var. *vacuolata* zeigen allerdings nur 6, und zwar 211-8h, -8a, -8b, -11n, -15, sowie C-1.1.10, das zu erwartende Ergebnis von ca. 100% Hybridisierung mit der markierten DNA von *C. fusca* 211-8b. Für die abweichenden Ergebnisse der übrigen 4 Stämme gab es bisher noch keinen Hinweis. Sie sind in ihren biochemischen und physiologischen Leistungen (cf. KESSLER, 1976) sowie im GC-Gehalt der DNA vollkommen einheitlich (HELLMANN u. KESSLER, 1974).

Für Bakterien haben DE LEY et al. (1966) gefordert, daß alle Xanthomonas-Stämme mit mehr als 90% DNA-Homologie, die bis dahin als eigenständige Arten geführt wurden, zu einer Art zusammengefaßt werden sollen.

MEYER et al. (1975) fanden bei Filterhybridisierungen von Hefe-DNA minimal 86% Homologie innerhalb einer Art, GOLDBERG et al. (1972) in einer Cucurbita-Art 86% Homologie bei den repetitiven Sequenzen, ENTINGH (1970) bei zwei Stämmen einer Drosophila-Art 100% Homologie.

Auf die abweichenden Stämme von *C. fusca* übertragen würde dies bedeuten, daß 211-8c und 211-11m, sowie 211-8e und 211-8g nicht zur Art *C. fusca* gehören können, was zumindest für letztere nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich ist. Ein Hybridisierungsgrad von 35% bzw. 25% bei der Reaktion mit DNA eines artverwandten Stammes spricht nicht für eine enge Verwandtschaft. Endgültig kann dieses Problem nur durch weitere Versuche geklärt werden (siehe Diskussion).

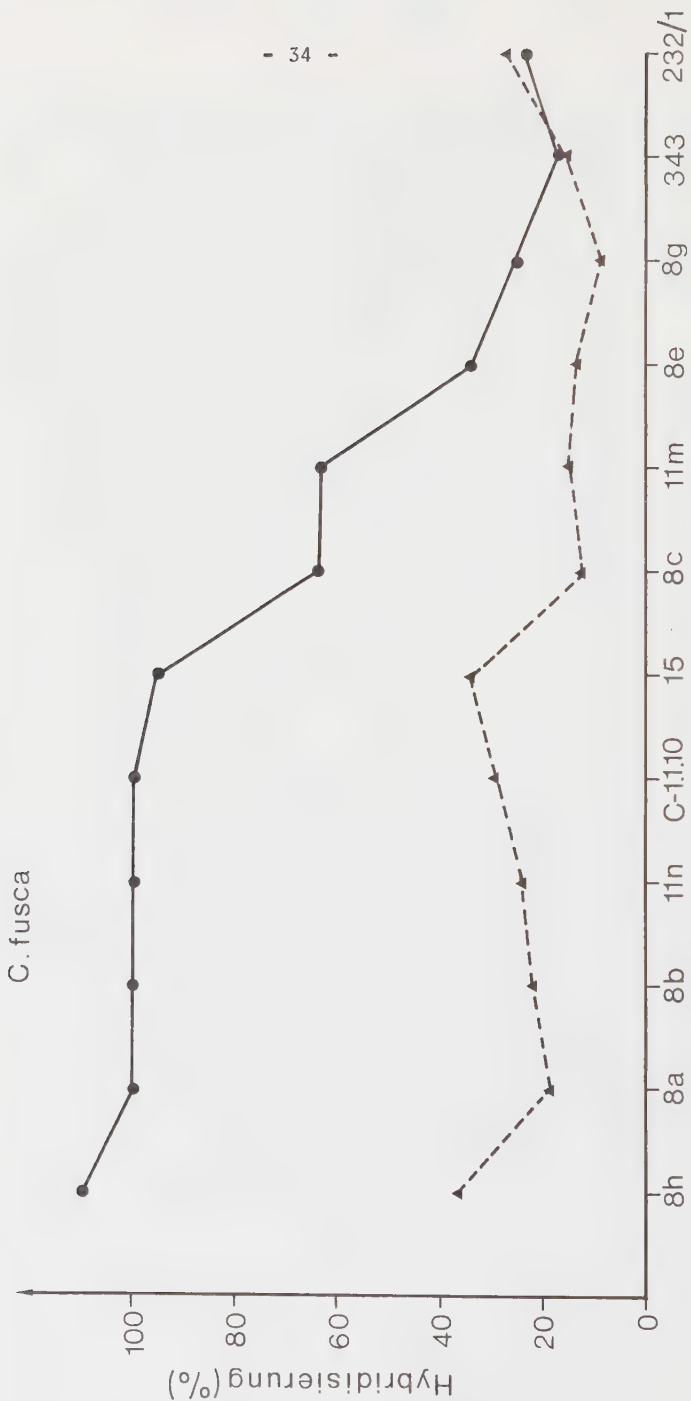


Abb. 6: Hybridisierung von *C. fusca*-DNA mit markierter DNA von

C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)

C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

Chlorella homosphaera

Der einzige Stamm 211-8e(Ca.) hybridisiert sowohl mit *C. fusca* (6.3%) als auch mit *C. vulgaris* (6.9%) so schlecht, daß man dafür plädieren muß, ihn aus der Gattung *Chlorella* zu streichen. Diese Alge unterschied sich schon vorher deutlich von den übrigen *Chlorellen*, als sie sich sehr wenig säureresistent und äußerst salzempfindlich zeigte (KESSLER, 1974) sowie unfähig war, Glukose zu vergären (VINAYAKUMAR u. KESSLER, 1975)

Chlorella luteoviridis

zeigte sich, wie bei allen bisher untersuchten Eigenschaften, recht einheitlich und scheint von *C. fusca* genau so weit entfernt zu sein wie von *C. vulgaris*, was auch dem "Stammbaum" nach KESSLER (1967) entspricht.

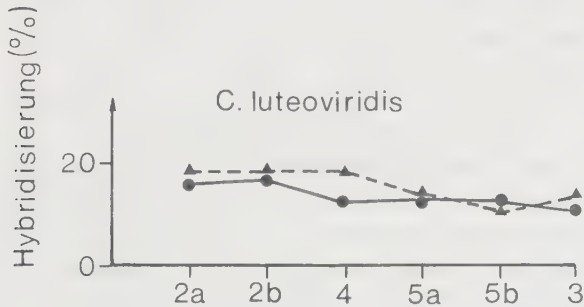


Abb. 7: Hybridisierung von *C. luteoviridis*-DNA mit
C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)
C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

Chlorella saccharophila

Die 8 Stämme wurden ursprünglich nicht unter der einen Art *C. saccharophila* geführt, sondern getrennt unter *C. ellipsoidea* (Stämme 211-1a, -1b, -1c, -1d, -1f) und *C. saccharophila* (Stämme 211-9a und 9b) (KESSLER et al., 1963). Nach der Zusammenfassung der 7 Stämme auf Grund des Merkmals "Säureresistenz" (KESSLER, 1965) und der Zuordnung von *C. ellipsoidea* C-1.3.1 (KESSLER, 1967) ergaben sich besonders in Hinblick auf die Stellung der Stämme 211-1a und C-1.3.1 immer wieder Probleme. HELLMANN und KESSLER (1974) fanden, daß sich diese deutlich von den anderen Stämmen im GC-Gehalt der DNA unterschieden, VINAYAKUMAR u. KESSLER (1975) konnten 211-1a und C-1.3.1 wegen Milchsäurebildung bei der Vergärung von Glukose abtrennen. Außerdem zeigten sie gegenüber den anderen Stämmen eine geringere Salztoleranz (KESSLER, 1974). Den vorliegenden Ergebnissen (Tabelle 3 und Abbildung 8) kann man entnehmen, daß sich die Stämme 211-1b, -1c, -1d, -1f einheitlich verhalten, wobei sie *C. vulgaris* näher zu stehen scheinen. Die Stämme 211-9a und -9b reagieren ebenfalls gleichartig, wobei die Homologie größer ist als bei den vorher genannten Stämmen. Demzufolge sollte man überlegen, ob es nicht sinnvoll wäre, zu der ursprünglichen Einteilung zurückzukehren. Die Zuordnung der Stämme 211-1a und C-1.3.1 kann noch nicht endgültig geklärt werden. 211-1a tendiert zu 211-9a und -9b, aber C-1.3.1 fällt ganz aus der Art *C. saccharophila* heraus, was sich ja schon vorher angekündigt hatte.

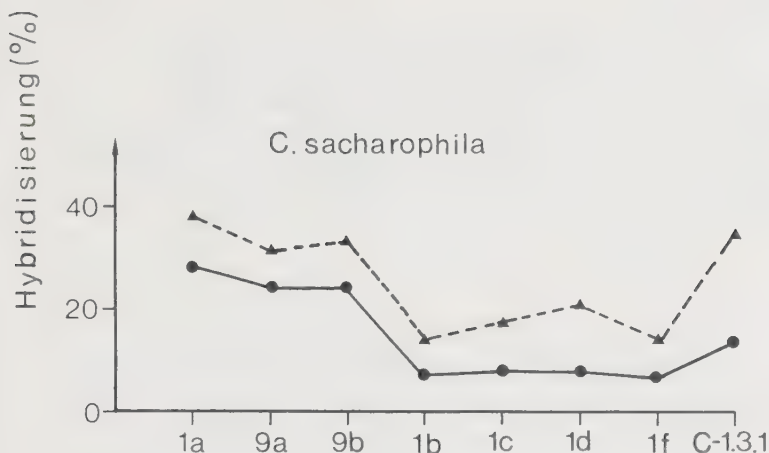


Abb. 8: Hybridisierung von *C. saccharophila*-DNA mit
C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)
C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

Chlorella zofingiensis

Bei dieser Art gab es nur mit dem Stamm C-1.2.1 Zuordnungsschwierigkeiten. Die Stämme 211-14a, -14b, -14c verhielten sich bei allen Untersuchungen recht einheitlich.

C-1.2.1 zeigte an seiner Wachstumsgrenze sowohl bei saurem p_H (KESSLER, 1967) als auch bei steigendem Salzgehalt des Nährmediums (KESSLER, 1974) im Gegensatz zu den anderen 3 Stämmen keine Bildung von Sekundäracarotinoiden und unterscheidet sich von diesen auch deutlich im GC-Gehalt der DNA (HELLMANN und

KESSLER, 1974).

Auch die DNA-DNA-Hybridisierungen zeigen (Tabelle 3 und Abbildung 9) ein diesen Befunden entsprechendes Bild und bestätigen die Ausgliederung von C-1.2.1 aus der Art *C. zofingiensis* (cf. KESSLER, 1976).

Weiterhin kann man sehen, daß *C. zofingiensis* *C. fusca* näher steht als *C. vulgaris*, wie auch von KESSLER (1967) beschrieben.

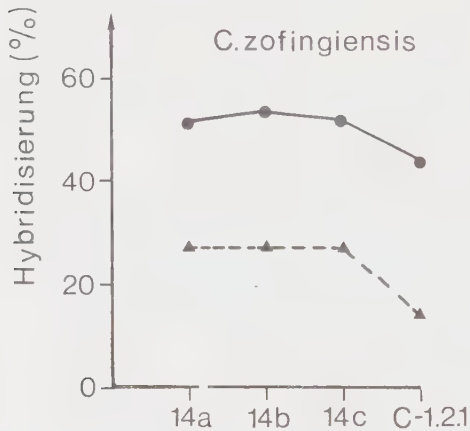


Abb. 9: Hybridisierung von *C. zofingiensis*-DNA mit
C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)
C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

Chlorella kessleri

Überraschenderweise scheint *C. kessleri*, deren Stämme sich bei allen bisherigen Untersuchungen recht einheitlich verhielten, in zwei Gruppen zu zerfallen (siehe Tabelle 3 und Abbildung 10), wobei die Stämme 398, C-1.1.1, C-1.1.12 und C-1.2.2 deutlich weniger als 10% homologe DNA-Sequenzen mit *C. fusca* und *C. vulgaris* haben, und somit kaum noch als Chlorellen bezeichnet werden können.

Auch dieser Befund könnte erst durch weitergehende Untersuchungen (siehe Diskussion) endgültig geklärt werden. Es sei in diesem Zusammenhang allerdings noch auf die Ergebnisse von KESSLER (1972) und KESSLER und CZYGAN (1970) verwiesen, wonach sich *C. kessleri* von allen anderen autotrophen *Chlorella*-Arten durch eine ausgeprägte Fähigkeit zu heterotrophem Wachstum unterscheidet.

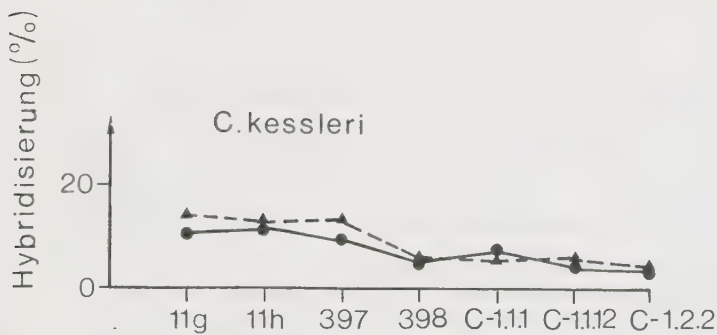


Abb. 10: Hybridisierung von *C. kessleri*-DNA mit
C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)
C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

Chlorella minutissima

Zu den Hybridisierungsergebnissen von *C. minutissima*-DNA (siehe Tabelle 3) kann man nur bemerken, daß es richtig war, den Stamm C-1.1.9 als *Chlorella V* von *C. vulgaris* abzutrennen (KESSLER, 1967), da sie mit deren DNA genau so geringe Übereinstimmung zeigt wie mit *C. fusca*-DNA.

Chlorella vulgaris

Innerhalb der Art *C. vulgaris* gab es von jeher Schwierigkeiten mit den Stämmen 211-11r und 211-30, die sich auch im GC-Gehalt der DNA von den übrigen Stämmen unterscheiden (HELLMANN und KESSLER, 1974). 211-30 kann ebenso wie *C. homosphaera* Glukose nicht vergären (VINAYAKUMAR u. KESSLER, 1975). Bei der Untersuchung der Gärungsprodukte wichen auch 211-81, -11q, -11s, -12, -21, 395 und 396 von den übrigen Stämmen ab (VINAYAKUMAR u. KESSLER, 1975). Auch bei der Salztoleranz (KESSLER, 1974) und der Säureresistenz (KESSLER, 1965) ergaben sich Abweichungen, die aber in keinem Fall gravierend waren. Die vorliegenden Ergebnisse (siehe Tabelle 3 und Abbildung 11) zeigen, daß *C. vulgaris* doch keine homogene Art ist.

Man kann ohne die Stämme 211-11r und 211-30, die wie bisher deutlich abgegrenzt werden können, *C. vulgaris* in 3 Gruppen einteilen.

Entsprechend dem zur homologen Reaktion bei *C. fusca* Bemerkten muß man sagen, daß bei strenger Auslegung der für eine einheitliche Art zu erwartenden Ergebnisse nur die Stämme 211-81, -8m, -11c, -19, 395 und 396 diesem Kriterium entsprechen. Man ist geneigt, diese Gruppe um die Stämme 211-21, -11l, und -11p zu erweitern,

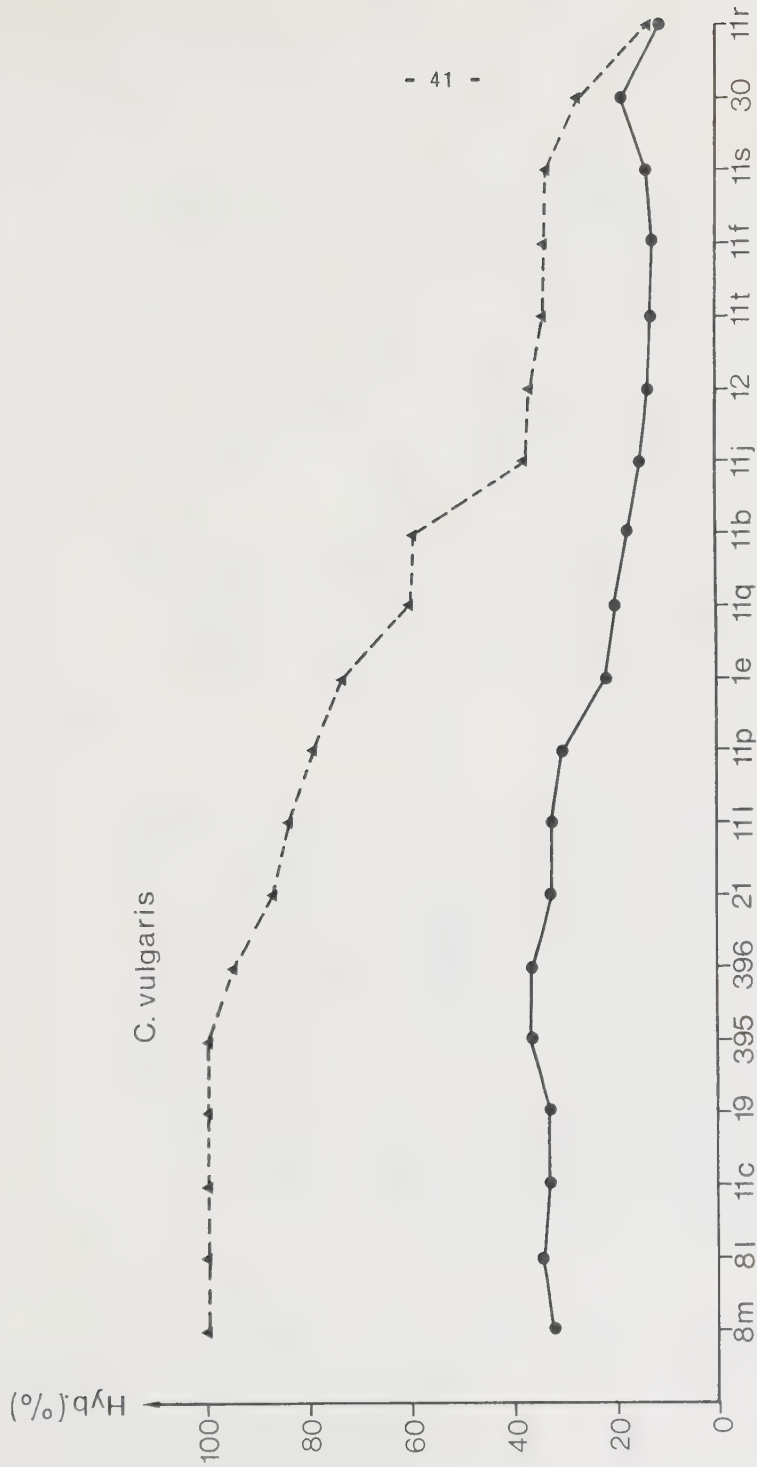


Abb. 11: Hybridisierung von *C. vulgaris*-DNA mit markierter DNA von

C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)

da erst anschließend bei 211-1e der Wert für die homologe Reaktion deutlich unter 80% fällt und auch bei der heterologen Reaktion mit *C. fusca* ein deutlicher Abfall zur 20% Grenze eintritt.

Die zweite Gruppe müßte die Stämme 211-1e, -11b, -11q umfassen, die mit *C. vulgaris* 211-8m 73.6 - 58.8% DNA-Homologie aufweisen, mit *C. fusca* 22.1 - 17.4%.

Die 3. Gruppe, die nur ca. 34% Homologie mit der DNA von *C. vulgaris* 211-8m zeigt, kann man auf Grund dieses Ergebnisses schwerlich als *Chlorella vulgaris* betrachten.

Bei den Stämmen 211-30 und 211-11r wird die Differenz zwischen den Hybridisierungsdaten mit *C. vulgaris* und *C. fusca* (mit 8.8% bzw. 1.7%) noch geringer, als bei den bisher unter *C. vulgaris* besprochenen Stämmen, wodurch sie sich klar von den übrigen Stämmen abgrenzen lassen.

Chlorella sorokiniana

Diese Art ließ sich von den übrigen *Chlorellen* durch das Merkmal "Thermophilie" klar abgrenzen, was KESSLER (1972) veranlaßte zu fordern, dieser ehemaligen *C. vulgaris* f. *tertia* einen höheren systematischen Rang als den einer Form zuzuerkennen. Die Untersuchung des GC-Gehaltes der DNA unterstrich die Berechtigung dieser Forderung, da sich die "f. *tertia*" hier deutlich von *C. vulgaris* unterschied. Nachdem die Stämme der jetzigen *C. sorokiniana* sich bis dahin recht einheitlich verhielten, ergab die Bestimmung des GC-Gehaltes erste Anhaltspunkte dafür, daß die Art eventuell in 3 Gruppen aufgeteilt werden muß (HELLMANN u. KESSLER, 1974).



Abb. 12: Hybridisierung von *C. sorokiniana*-DNA mit markierter DNA von

C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)

C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

Die Abtrennung der Stämme Prag A14, 211-40a und 211-40c, die von HELLMANN und KESSLER (1974) gefordert wurde, kann nach den vorliegenden Ergebnissen unterstützt werden. Diese Stämme sind auch die einzigen dieser Art, die eine deutlich stärkere Tendenz zu *C. vulgaris* zeigen, alle anderen sind anscheinend von *C. vulgaris* genau so weit entfernt wie von *C. fusca*.

Als zweite Gruppe bietet sich eine Zusammenfassung der Stämme 211-8k, -11d, -11k, -18, -32, Sless 1 und 1-9-30 an, die mit *C. fusca* zu ca. 25% und mit *C. vulgaris* zu ca. 27% hybridisieren.

Eine weitere Gruppe könnten 211-31, -33, -34 und Sless2 bilden. Die Stämme C-1.1.8 und C-1.6.7 lassen sich nicht in eine dieser Gruppen einordnen.

Eine weitere Klärung der Einteilung der *C. sorokiniana*-Stämme könnte die Hybridisierung mit der DNA eines gut definierten Stammes dieser Art leisten.

Chlorella protothecoides

Diese Art verhielt sich bei den bisherigen Untersuchungen recht einheitlich und bestätigt dies bei den vorliegenden Ergebnissen (siehe Tabelle 3 und Abbildung 13). Nur der Stamm 211-11a mit mehr als 13% Homologie mit *C. vulgaris* und *C. fusca*-DNA und eventuell noch die Stämme 211-7a und 211-7c mit 11.6 bzw. 18.5% Homologie mit *C. vulgaris*-DNA, aber unter 10% mit *C. fusca*-DNA heben sich von den übrigen Stämmen ab.

Alle anderen Stämme dieser Art hybridisieren jeweils zu weniger als 10%, weswegen man dafür plädieren sollte, sie aus der Gattung *Chlorella* auszugliedern. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß alle 14 Stämme auxotroph (benötigen Thiamin) und mesotroph (können kein NO_3^-)



Abb. 13: Hybridisierung von *C. protothecoides*-DNA mit markierter DNA von

C. fusca 211-8b (durchgezogene Linie)

C. vulgaris 211-8m (unterbrochene Linie)

verwerten) sind (KESSLER und ZWEIER, 1971) und sich schon dadurch deutlich von allen anderen Chlorellen unterscheiden, die ausnahmslos autotroph sind. Das abweichende Hybridisierungsverhalten der drei zuerst genannten Stämme müßte noch genauer untersucht werden.

Die in Tabelle 4 angeführten Hybridisierungsergebnisse von *C. vulgaris* 211-8m DNA mit je einem Stamm der Chlorella recht nahe stehenden Gattungen *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* und *Prototheca* sind, da sie nur punktuell durchgeführt wurden, ohne große Aussagekraft. Interessant ist nur, daß der Stamm von *Prototheca*, die sich durch Verlust des Chloroplasten von *Chlorella protothecoides* ableiten soll (KESSLER, 1977), ein genau so schlechtes Hybridisierungsergebnis wie diese zeigt.

IV. DISKUSSION

Bei morphologisch einheitlichen Mikroorganismen kann eine Taxonomie nach den klassischen morphologisch-cytologischen Merkmalen nur von Spezialisten bewältigt werden, wie dies im Falle der Chlorellen von FOTT u. NOVAKOVA (1969) mit Erfolg durchgeführt wurde. Auch dann kann das Ergebnis unbefriedigend ausfallen, wie das Beispiel von *C. vulgaris* und *C. sorokiniana* (vorher *C. vulgaris* f. *tertia*) zeigte, die morphologisch identisch sind, sich aber in zwei wichtigen physiologischen Eigenschaften unterscheiden: *C. sorokiniana* besitzt im Gegensatz zu *C. vulgaris* das Enzym Hydrogenase und ist thermophil.

Da viele Mikroorganismen wegen ihrer leichten Kultivierbarkeit und ihrer kurzen Generationszeiten für physiologische und biochemische Versuche verwendet werden, ist es naheliegend, durch Untersuchungen bestimmter Stoffwechselaktivitäten zu versuchen, eine Klassifizierung zu erreichen. KESSLER und MITARBEITER (siehe Literaturverzeichnis und KESSLER, 1976) konnten mit viel Erfolg Stoffwechselaktivitäten zur Taxonomie der Gattung *Chlorella* verwenden. Da trotzdem für einige Stämme weiterhin Zuordnungsschwierigkeiten (z.B. der Stämme 211-1a und C-1.3.1 zu *C. saccharophila*, Stamm C-1.2.1 zu *C. zofingiensis*) bestehen bleiben, war es naheliegend, zunehmend konservative Merkmale zur Klassifizierung heranzuziehen, wie dies bei den morphologisch ebenfalls recht einheitlichen Bakterien mit Erfolg getan wurde.

Die Untersuchung des GC-Gehaltes der Kern-DNA (HELLMANN u. KESSLER, 1974) konnte die bestehende Taxonomie weitgehend bestätigen. Es zeigte sich, daß einige der unsicheren Stämme einen deutlich von

den übrigen Stämmen ihres Taxons unterschiedlichen GC-Gehalt haben und deswegen ausgegliedert werden sollten.

Andererseits ergaben sich durch diese Untersuchungen auch völlig neue Aspekte, wie z.B. daß die bisher sich recht einheitlich verhaltende Art *C. sorokiniana* in drei Gruppen aufzuspalten scheint, und daß der GC-Gehalt der Chlorellen für eine natürliche Gattung ein außergewöhnlich weites Spektrum aufweist (43% - 79%). Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, daß bei der gleichen Untersuchung der morphologisch wesentlich besser charakterisierbaren und physiologisch einheitlichen Gattungen *Scenedesmus* und *Ankistrodesmus* sich wesentlich engere Grenzen für den GC-Gehalt ergaben, führen zu der Frage, ob *Chlorella* tatsächlich eine natürliche Gattung oder ein Konglomerat morphologisch ähnlicher aber z.T. nicht sehr eng verwandter Arten ist.

In ausführlicher Diskussion weist HELLMANN (1973) darauf hin, daß der GC-Gehalt nur im Sinne einer Taximetrie verwendet werden kann. Der nächste Schritt muß eine Bestimmung der homologen DNA-Sequenzen mit Hilfe von DNA-Hybridisierungen sein, wie dies z.B. DE LEY et al. (1966) bei Bakterien durchgeführt haben, weil nur über diesen Weg bestehende Taxa umgestoßen werden können.

Der Versuch, bei allen auch von HELLMANN (1973) verwendeten 88 *Chlorella*-Stämmen die homologen Anteile der DNA zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit unternommen.

Bei der angewandten Technik der Filterhybridisierung sind die eingesetzten DNA-Konzentrationen so gering, daß von der Eukaryonten-DNA nur die repetitiven Anteile reagieren (BRITTEN u. KOHNE, 1968; MELLI u.

BISHOP, 1969), die artspezifisch sind (BRITTEN u. KOHNE, 1968; PARDUE, 1975), aber wegen ihrer schnellen Mutation und Vervielfältigung einiger ursprünglich gemeinsamer Sequenzen, die dann "Familien" ähnlicher Sequenzen bilden, eine mit zunehmender Dauer immer stärker werdende Divergenz von Art zu Art aufweisen. Dagegen sind die Sequenzen der single-copy DNA wesentlich stabiler und können deswegen besser zur Bestimmung der Verwandtschaft der Arten einer Gattung verwendet werden (RICE u. STRAUS, 1973; SHIELDS u. STRAUS, 1975). Bei der vorliegenden Untersuchung wurde die Tatsache, daß die repetitiven Sequenzen artspezifisch und deswegen zur Überprüfung der Frage, ob wirklich nur zu einer Art gehörige Stämme zusammengefaßt wurden, geeignet sind, ausgenutzt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Arten zum Teil sehr einheitlich sind, wie etwa *C. luteoviridis* und *C. zofingiensis*. Weiterhin kann bestätigt werden, daß die Ausgliederung fraglicher Stämme berechtigt war. *C. fusca* var. *fusca*, die neuerdings von FOTT et al. (1975) zur Gattung *Scenedesmus* gestellt wird, kann wirklich nicht zu *C. fusca* gerechnet werden. Der Stamm C-1.2.1 unterscheidet sich nicht nur im GC-Gehalt (HELLMANN u. KESSLER, 1974), sondern auch im Hybridisierungsverhalten gegenüber der DNA von *C. fusca* 211-8b und *C. vulgaris* 211-8m deutlich von den übrigen 3 Stämmen. Dies gilt auch entsprechend für die Stämme C-1.3.1 von *C. saccharophila*, 211-30 und 211-11r von *C. vulgaris*.

Einige Stämme zeigen eine so geringe DNA-Homologie mit 211-8b und 211-8m, daß angenommen werden muß, hier können keine Chlorellen vorliegen. Dies trifft für *C. homosphaera* 211-8e(Ca.), für *C. protothecoides* und eventuell für einige Stämme von *C. kessleri* zu.

Eine vermutete Aufspaltung von *C. sorokiniana* kann bestätigt werden; überraschenderweise zeigte sich eine ähnliche Tendenz bei *C. fusca*, *C. kessleri* und *C. vulgaris*. Die Zusammenfassung von *C. ellipsoidea* und *C. saccharophila* zu *C. saccharophila* (KESSLER, 1965) sollte wieder rückgängig gemacht werden, nachdem sich die Stämme 211-9a und -9b so deutlich von den vier Stämmen -1b, -1c, -1d und -1f unterscheiden. Diese Gruppen von identisch reagierenden Stämmen der Arten, sowie charakteristische Stämme jeder Art sollten den Ausführungen von SHIELDS u. STRAUS (1975) entsprechend durch Reassoziationen der single copy DNA und Bestimmung der thermischen Stabilität der Doppelstränge (LAIRD et al., 1969) endgültig ihrer Stellung in der Gattung *Chlorella* entsprechend eingeordnet werden können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde aus 88 Stämmen der Gattung *Chlorella* hochreine und hochmolekulare DNA isoliert.

Die für die Hybridisierungsversuche benötigte radioaktiv markierte DNA wurde durch in vitro-Markierung von Kern-DNA der Stämme 211-8b und 211-8m gewonnen. Die in vivo-Markierung ist nicht sehr effektiv; die so gewonnene DNA hat eine viel zu geringe spezifische Aktivität.

Die Bedingungen für die DNA-DNA-Hybridisierungen mit an Nitrozellulose gebundener nicht-markierter DNA wurden weitgehend optimiert und konstant für die Hybridisierung der DNA aller 88 Stämme mit markierter DNA der Stämme *C. fusca* 211-8b und *C. vulgaris* 211-8m angewendet.

Es zeigte sich, daß die Ergebnisse der Filterhybridisierungen die bisherige Taxonomie recht gut bestätigen.

Die Berechtigung der Ausgliederung einiger Stämme konnte bestätigt werden. Darüber hinausgehend muß die Abtrennung weiterer Stämme gefordert werden. Neben *C. sorokiniana* spalten auch *C. fusca* und *C. vulgaris* in mehrere Gruppen auf.

C. saccharophila sollte wieder in *C. saccharophila* und *C. ellipsoidea* geteilt werden.

VI. LITERATUR

BAYEN M. and DALMON J.:

Heterogeneity of *Chlorella pyrenoidosa*
nuclear DNA (strain 211/8b and strain
Emerson)

Plant Sci. Lett. 2, 311-317 (1974)

BAYEN M., RODE A. and DALMON J.:

Incorporation of radioactive thymidine
into the nucleic acids of *Chlorella*
pyrenoidosa (211/8b)

Z. Pflanzenphysiol. 70, 322-332 (1973)

BENDICH A.J. and BOLTON E.T.:

Relatedness among plants as measured
by the DNA-agar technique

Plant Physiol. 42, 959-967 (1967)

BENDICH A.J. and MCCARTHY B.J.:

DNA comparisons among barley, oats, rye
and wheat

Genetics 65, 545-565 (1970)

BORNKAMM G.W., STEIN H., LENNERT K., RÜGGERBERG F.,

BARTELS H. and ZUR HAUSEN H.:

Attempts to demonstrate virus-specific
sequences in human tumors. IV. EB viral
DNA in European Burkitt Lymphoma and
Immunoblastic Lymphadenopathy with
excessive plasmacytosis

Int. J. Cancer 17, 177-181 (1976)

BRITTEN R.J. and KOHNE D.E.:

Repeated sequences in DNA
Science 161, 529-540 (1968)

BRITTEN R.J., GRAHAM D.E. and NEUFELD B.R.:

Analysis of repeating DNA sequences by
reassociation
In : Methods in Enzymology, Vol. XXIX
(Ed. Grossman L. and Moldave K.),
363-406, Academic Press, New York and
London (1974)

CHOOI W.Y.:

Comparison of the DNA of six Vicia
species by the method of DNA-DNA hybridisation
Genetics 68, 213-230 (1971)

DALMON J. and BAYEN M.:

The chloroplastic DNA of Chlorella
pyrenoidosa (Emerson strain): heterogeneity and complexity
Arch. Microbiol. 103, 57-61 (1975)

DALMON J., BAYEN M. and RODE A.:

Incorporation of radioactive pyrimidic
precursors into the deoxyribonucleic
acids of Chlorella pyrenoidosa, strain
Emerson
Z. Pflanzenphysiol. 74, 189-199 (1975)

DE LEY J. and PARK I.W.:

Molecular biological taxonomy of some
free-living nitrogen-fixing bacteria
Antonie van Leeuwenhoek 32, 5-16 (1966)

DE LEY J., PARK I.W., TIJTGAT R. and VAN ERMENGEM J.:

DNA homology and taxonomy of *Pseudomonas*
and *Xanthomonas*

J. gen. Microbiol. 42, 43-56 (1966)

DENHARDT D.T.: A membrane-filter technique for the
detection of complementary DNA

Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-
646 (1966)

DUMAS L.B., DARBY G. and SINSHEIMER R.L.:

The replication of bacteriophage ϕX_{174}
DNA in vitro, temperature effects on
repair synthesis and displacement
synthesis

Biochim. Biophys. Acta 228, 407-422 (1971)

ENTINGH T.D.: DNA hybridization in the genus

Drosophila

Genetics 66, 55-68 (1970)

FETTER F. und ALTMANN H.:

Über die Verwertung von Thymin und
Thymidin als DNS-Vorstufe in *Chlorella*
pyrenoidosa

Monatshefte für Chemie 99, 1076-1079 (1968)

FOTT B. and NOVÁKOVÁ M.:

A monograph of the genus *Chlorella*.
The fresh water species. In: Studies
in Phycology, p. 10-74

B. Fott, ed. Prag, Verlag Akad. Wis-
sensch. (1969)

FOTT B., LOCHHEAD R. und CLÉMENCON H.:

Taxonomie der Arten *Chlorella ultra-*
squamata Clem. et Fott und *Chlorella*
fusca Shih. et Krauss
Arch. Protistenk. 117, 288-296 (1975)

GOLDBERG R.B., BEMIS W.P. and SIEGEL A.:

Nucleic acid hybridization studies within
the genus *Cucurbita*
Genetics 72, 253-266 (1972)

HELLMANN V.: Die Basenzusammensetzung der DNS der
Grünalge *Chlorella*
Dissertation Universität Erlangen-
Nürnberg (1973)

HELLMANN V. und KESSLER E.:

Physiologische und biochemische Beiträge
zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*.VIII.
Basenzusammensetzung der DNS
Arch. Microbiol. 95, 311-318 (1974)

HELLMANN V. und KESSLER E.:

Physiologische und biochemische Beiträge
zur Taxonomie der Gattungen *Ankistrodesmus*
und *Scenedesmus*.III. Die Basenzusammen-
setzung der DNS
Arch. Microbiol. 100, 239-242 (1974)

HOYER B.H., MCCARTHY B.J. and BOLTON E.T.:

A molecular approach in the systematics
of higher organisms
Science 144, 959-967 (1964)

KELLY R.B., COZZARELLI N.R., DEUTSCHER M.P., LEHMAN I.R.
and KORNBERG A.:

Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break
J. Biol. Chem. 245, 39-45 (1970)

KERFIN W.: Vergleichende Untersuchungen des löslichen Gesamtproteins von 6 autotrophen Chlorella-Arten und Ankistrodesmus braunii
Dipl.-Arbeit Universität Erlangen-Nürnberg (1973)

KESSLER E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. I. Säureresistenz als taxonomisches Merkmal.
Arch. Mikrobiol. 52, 291-296 (1965)

KESSLER E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. III. Merkmale von 8 autotrophen Arten
Arch. Mikrobiol. 55, 346-357 (1967)

KESSLER E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. VI. Verwertung organischer Kohlenstoffverbindungen
Arch. Mikrobiol. 85, 153-158 (1972)

KESSLER E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. VII. Die Thermophilie von Chlorella vulgaris f. tertia Fott et Nováková
Arch. Mikrobiol. 87, 243-248 (1972)

- KESSLER E.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella.IX. Salzresistenz als taxonomisches Merkmal Arch. Microbiol. 100, 51-56 (1974)
- KESSLER E.: Comparative physiology, biochemistry, and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae) Plant Syst. Evol. 125, 129-138 (1976)
- KESSLER E.: Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus Prototheca I. Hydrogenase, acid tolerance, salt tolerance, thermophily, and liquefaction of gelatin. Arch. Microbiol. 113, 139-141 (1977)
- KESSLER E. und CZYGAN F.C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen Ankistrodesmus und Scenedesmus.I.Hydrogenase, Sekundär-Carotinoide und Gelatine-Verflüssigung Arch. Mikrobiol. 55, 320-326 (1967)
- KESSLER E. und CZYGAN F.C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella.IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen Arch. Mikrobiol. 70, 211-216 (1970)

KESSLER E. und ZWEIER I.:

Physiologische und biochemische Beiträge
zur Taxonomie der Gattung Chlorella.V.
Die auxotrophen und mesotrophen Arten
Arch. Mikrobiol. 79, 44-48 (1971)

KESSLER E., LANGNER W., LUDEWIG I. und WIECHMANN H.:

Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei
Stickstoffmangel und Hydrogenase-
Aktivität als taxonomische Merkmale
in der Gattung Chlorella. In studies on
microalgae and photosynthetic bacteria,
7-20. Tokyo:
Jap. Soc. Pl. Physiologists. (1963)

KESSLER E., CZYGAN F.C., FOTT B. und NOVÁKOVÁ M.:

Über Halochlorella rubescens DANGEARD
Arch. Protistenk. 110, 462-467 (1968)

KOHNE D.E.: Taxonomic applications of DNA hybridization techniques

In: Chemotaxonomy and Serotaxonomy, p.
117-130 J.G.Hawkes ed. :
Academic Press London (1968)

KORNBERG A.: DNA Synthesis. W.H.Freeman and Company,
San Francisco (1974)

LAIRD C.D. and MCCARTHY B.J.:

Magnitude of interspecific nucleotide
sequence variability in Drosophila
Genetics 60, 303-322 (1968)

LAIRD C.D., McCONAUGHY B.L. and McCARTHY B.J.:

Rate of fixation of nucleotide substitutions
in evolution
Nature 224, 149-154 (1969)

MANDEL M. and MARMUR J.:

Use of ultraviolet absorbance-temperature
profile for determining the guanine
plus cytosine content of DNA. In: Methods
in Enzymology, Vol. XII, p. 195-206
L. Grossmann and K. Moldave, eds. New-
York - London,
Academic Press (1968)

MARMUR J.: A procedure for the isolation of
deoxyribonucleic acid from microorganisms
J. mol. Biol. 3, 208-218 (1961)

MARMUR J. and DOTY P.:

Determination of the base composition
of deoxyribonucleic acid from its thermal
denaturation temperature
J. mol. Biol. 5, 109-118 (1962)

MARMUR J., ROWND R. and SCHILDKRAUT C.L.:

Denaturation and renaturation of
deoxyribonucleic acid. In: Progress in
Nucleic Acid Research, p. 231-300,
Davidson J.N. and Cohn W.E. eds, New York,
Academic Press (1963)

MELLI M. and BISHOP J.O.:

Hybridization between rat liver DNA
and complementary RNA
J. Mol. Biol. 40, 117-136 (1969)

MEYER S.A., ANDERSON K., BROWN R.E., SMITH M.TH.,
YARROW D., MITCHELL G. and AHEARN D.G.:

Physiological and DNA characterization
of *Candida maltosa*, a hydrocarbon-
utilising yeast

Arch. Microbiol. 104, 225-231 (1975)

OSHIO Y. and HASE E.:

Studies on nucleic acids in chloro-
plasts isolated from *Chlorella protb-*
thecoides

Plant Cell Physiol. 9, 69-85 (1968)

PARDUE M.L.: Repeated DNA sequences in the
chromosomes of higher organisms
Genetics 79, 159-170 (1975)

RICE N.R. and STRAUS N.A.:

Relatedness of mouse satellite deoxy-
ribonucleic acid of various *Mus* species
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3545-3550
(1973)

SEARCY D.: Measurements by DNA hybridization in
vitro of the genetic basis of parasitic
reduction
Evolution 24, 207-219 (1970)

SHIELDS G.F. and STRAUS N.A.:

DNA-DNA hybridization studies of birds
Evolution 29, 159-166 (1975)

VINAYAKUMAR M. and KESSLER E.:

Physiological and biochemical contributions
to the taxonomy of the genus *Chlorella*.X.
Products of glucose fermentation
Arch. Microbiol. 103, 13-19 (1975)

WANKA F., JOOSTEN H.F.P. and DE GRIP W.J.:

Composition and synthesis of DNA in
synchronously growing cells of *Chlorella*
pyrenoidosa
Arch. Mikrobiol. 75, 25-36 (1970)

WETMUR J.G. and DAVIDSON N.:

Kinetics of renaturation of DNA
J. Mol. Biol. 31, 349-370 (1968)

Herrn Professor Dr. E. Kessler danke ich für die Anregung dieser Arbeit und seine stete Unterstützung während ihres Fortgangs.

Herrn Dr. G. Bornkamm (Institut für Klinische Virologie) danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik der DNA-Markierung und -Hybridisierung.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Universitätsbundes gefördert.

Lebenslauf

23.4.1947 in Engelsdorf als Sohn des Ingenieurs
Siegfried Kerfin und seiner Ehefrau
Brunhilde, geb. Oppermann geboren

1953 - 1957 Besuch der Grundschule in Meerbeck

1957 Besuch des Gymnasiums in Moers

Juli 1967 Reifeprüfung am Hans-Sachs-Gymnasium
Nürnberg

WS 1967/68 - Biologiestudium in Erlangen
SS 1973

1970 Diplom-Biologen-Vorprüfung

1973 Diplom-Biologen-Hauptprüfung

Juli 1974 - DFG-Stipendiat
Juli 1975

1975 - 1976 Stipendiat im Sinne des Graduierten-
förderungsgesetzes in Erlangen

Copy - Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197